



UDC 547.973 + 543.4

SPECTRAL CHARACTERISTICS OF PROTOCYANIN SUPRAMOLECULAR PIGMENT AS PHARMACOGNOSTIC CRITERIA OF *CENTAUREA CYANUS* L. FLOWERS

Volodymyr S. Fedenko

Oles Honchar Dnipro National University, 72, Science Ave., Dnipro 49010, Ukraine
Received 5 February 2024; accepted 3 June 2023; available online 25 April 2024

Abstract

The results of the study of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) petals by the spectrophotometric method are presented. It has been established that a set of spectral characteristics of the supramolecular pigment complex of protoctyanin in the petals can be used for the pharmacognostic analysis of medicinal raw materials: the presence of a long-wavelength band with distributed maxima in the reflectance spectra and a color stimulus with a dominant wavelength in the blue range. The identified diagnostic features distinguish the type with blue color as the main object in the preparation of raw materials of the official medicinal plant from other different colored types under the conditions of intraspecific polychroism of flowers. Native protoctyanin is obtained as a result of aqueous extraction of petals with a blue color. The appearance of maxima in the absorption spectrum of the aqueous blue extract corresponded to the characteristics of protoctyanin *in vivo* in the reflectance spectra of petals of the type with a blue color. The difference in the spectral properties of the chromophoric systems of these forms is established by the parameters of the differential absorption spectrum of the solution of unassociated anthocyanin after acid destruction of the native pigment complex relative to protoctyanin extract. Under the conditions of alcohol extraction of petals in an acidic environment, the destruction of pigment complexes, which are localized in surface tissues, and the formation of flavylum derivatives. In contrast to the reflectance spectra of multi-colored petals with a distributed band, a feature of the absorption spectra of their extracts is the presence of one maximum, the position of which depended on the type of coloring and indicated the dominance of pelargonidin or cyanidin glycosides. The obtained results improve the pharmacognostic criteria and can be used in the creation of biological preparations and functional food products based on raw cornflower.

Keywords: protoctyanin; cornflower petals; anthocyanins; copigmentation; reflectance spectra; colorimetry

СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАДМОЛЕКУЛЯРНОГО ПІГМЕНТУ ПРОТОЦІАНІНУ ЯК ФАРМАКОГНОСТИЧНІ КРИТЕРІЇ КВІТОК *CENTAUREA CYANUS* L.

Володимир С. Феденко

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, просп. Науки, 72, Дніпро, 49010, Україна

Анотація

Представлено результати дослідження пелюсток волошки синьої (*Centaurea cyanus* L.) спектрофотометричним методом. Встановлено, що для фармакогностичного аналізу лікарської сировини може бути використана сукупність спектральних характеристик надмолекулярного пігментного комплексу протоціаніну у пелюстках: наявність довгохвильової смуги із розподіленими максимумами у спектрах відбиття та кольоровий стимул із домінують довжиною хвилі у діапазоні синього кольору. Виявлені діагностичні ознаки відрізняють тип із синім забарвленням як основний об'єкт під час заготівлі сировини офіційної лікарської рослини від інших різнозабарвлених типів за умов внутрішньовидового поліхроїзму квіток. Нативний протоціанін отримано в результаті водної екстракції пелюсток із синім забарвленням. Прояв максимумів у спектрі поглинання водного синього екстракту відповідав характеристикам протоціаніну *in vivo* у спектрах відбиття пелюсток типу із синім забарвленням. Відмінність спектральних властивостей хромофорних систем цих форм встановлена за параметрами диференційного спектру поглинання розчину неасоційованого антоціану після кислотної руйнації нативного пігментного комплексу відносно екстракту протоціаніну. За умов спиртової екстракції пелюсток у кислому середовищі відбувалось руйнування пігментних комплексів, які локалізовані в поверхневих тканинах, і утворення похідних флавілія. На відміну від спектрів відбиття різнозабарвлених пелюсток із розподіленою смугою, особливістю спектрів поглинання їх екстрактів є наявність одного максимуму, положення якого залежало від типу забарвлення та свідчило про домінування глікозидів пеларгонідину або ціанідину. Отримані результати удосконалюють фармакогностичні критерії та можуть бути використані під час створення біопрепаратів і функціональних харчових продуктів на основі сировини волошки синьої.

Ключові слова: протоціанін; пелюстки волошки синьої; антоціани; копігментація; спектри відбиття; колориметрія.

*Corresponding author: e-mail: opticlaf.fedenko@gmail.com

© 2024 Oles Honchar Dnipro National University;

doi: 10.15421/jchemtech.v32i2.298075

Вступ

Серед проблем супрамолекулярної хімії привертають увагу дослідження надмолекулярних структур, для яких характерні наступні особливості: наявність певної кількості молекулярних блоків, інтегрованість індивідуальних характеристик компонентів в унікальні властивості всього структурного ансамблю, участь у процесах життєдіяльності організмів [1]. Серед таких структурних ансамблей відзначають унікальний пігментний комплекс металлоантоціанів, який забезпечує синє забарвлення квіток деяких рослин [2; 3]. Згідно із термінологічним визначенням [4] металлоантоціаном слід вважати утворений у процесі самозбирання стехіометричний комплекс метал-пігмент – природну надмолекулу, яка містить 6 молекул антоціану, 6 молекул флавону і два іони металу. Дотепер виділені та ідентифіковані такі металлоантоціани із синіх квіток рослин: протоціанін (волошка синя *Centaurea cyanus* L.), комелінін (комеліна звичайна *Commelina communis* L.), протодельфін (шавлія розлога *Salvia patens* Cav.), ціаносальвіанін (шавлія болотна *Salvia uliginosa* Benth.), неморфилін (немофіла Менціса *Nemophila menziesii* Hook. & Arn.) [4]. Утворення цих структур відбувається шляхом реалізації наступних послідовних етапів: попарна самоасоціація 6 молекул антоціану за рахунок гідрофобної стекінг-взаємодії; попарна самоасоціація 6 молекул флавону за аналогічним механізмом; утворення структурного ансамблю між парами самоасоційованих антоціанів і флавонів (копігментація); хелатування іонів металу із структурними фрагментами антоціанових пар (рис. 1). Кожен із компонентів металохелатів

(хромофор, копігмент, іон металу) має певне функціональне призначення, а їх поєднання зумовлює унікальні властивості цих складних комплексів. Спектральні властивості пігментних комплексів, що обумовлюють синє забарвлення рослинних тканин, забезпечуються завдяки хромофорній системі антоціанів. Для протоціаніну характерна наявність глікозиду ціанідину, а для інших комплексів – глікозидів дельфінідину, тобто антоціанів, які мають хелатуючий центр із двома або трьома гідроксильними групами у катехольному або пірогалольному фрагменті. Слід зазначити, що антоціан у складі комплексу знаходиться у 4'-кето-хіноїдній формі [5], для якої характерно саме синє забарвлення. Стосовно глікозидування антоціанів слід відзначити певну закономірність у положенні залишків: обов'язкове заміщення у положенні 3 та додаткове заміщення у положенні 5. До того ж глікозидування не відбувається по о-гідроксильним групам кільця В у хелатуючому центрі. Глікозидування підвищує стійкість антоціанової структури, а реакційноздатні COOH-групи залишків дикарбонових кислот дають можливість додаткової стабілізації за рахунок зв'язування *in vivo*. Роль копігменту полягає у стабілізації хіноїдної форми антоціанів. Хіноїдна форма антоціанів у складі пігментних комплексів також стабілізується за рахунок зв'язування з іонами металів. Переваги надмолекулярної структури проявляються у стабільності пігментного комплексу за фізіологічних значень рН, а також у підвищенні стійкості до УФ-випромінювання, що має суттєве значення для здійснення функціональної ролі антоціанів у процесі цвітіння рослин за умов сонячної радіації [4].

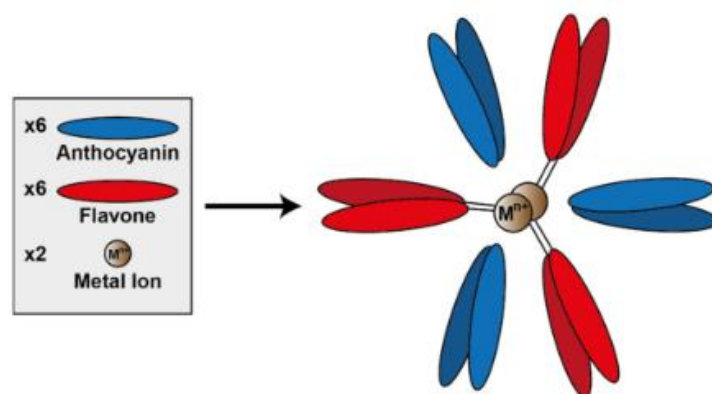


Fig. 1. Scheme of formation of metalloanthocyanins [3, 4]
Рис. 1. Схема утворення металлоантоціанів [3, 4]

Надмолекулярний комплекс протоціаніну складається з шести молекул ціанідин 3-O-(6-O-сукциніл глюкозид)-5-O-глюкозиду (сукцінілціанін) **1**, шести молекул апігенін 7-O-глюкуронід-4'-O-(6-O-малонілглюкозиду) (малонілфлавіон) **2** (рис. 2) і двох внутрішніх

іонів металу (Fe^{3+} , Mg^{2+}) [4]. Крім того, два зовнішні іони Ca^{2+} координуються з трьома молекулами малонілфлавіону **2**, що стабілізує кристалічну структуру протоціаніну, однак не впливає на формування синього забарвлення [4].

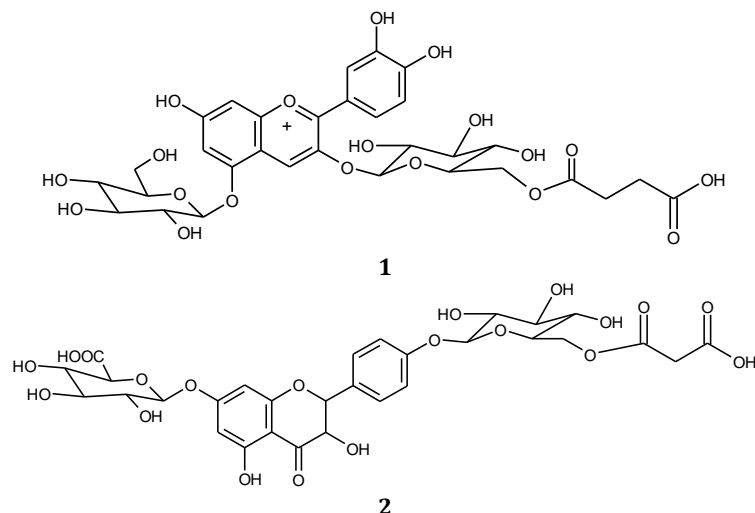


Fig. 2. Chemical structure of protocyanin components
Рис. 2. Хімічна структура компонентів протоціаніну

Слід зазначити, що для квіток *Centaurea cyanus*, окрім синього, характерні також інші типи забарвлення (біле, відтінки червоного і пурпурового). Для пояснення цього феномену слід врахувати наступні чинники. Біологічний чинник пов'язано із системою генетичного контролю біосинтезу антоціанових пігментів, флавонів і флавонолів [6; 7]. Серед хімічних чинників поліхроїзму квіток волошки синьої відзначають рівень накопичення у рослинних тканинах похідних ціанідину або пеларгонідину, флавонів із різним положенням глікозидних замісників та співвідношення загального вмісту флавоноїдів та антоціанів, що обумовлює ефект копигментації [6]. Важливість природи антоціану полягає у тому, що для пеларгонідину наявність лише однієї гідроксильної групи у кільці В унеможливує хелатування іонів металу, що характерно для типів із червоним забарвленням. У разі похідних ціанідину присутність додаткової гідроксильної групи в орто-положенні бензольного кільця В зумовлює здатність до утворення металохелату (протоціаніну). Фізичні чинники пояснюють формування кольорового стимулу, який викликає відповідне візуальне забарвлення рослинних тканин. У разі домінування копигментованої форми антоціанів (протоціанін) стимул знаходиться у діапазоні синього кольору,

неасоційованої флавілієвої форми – червоного кольору, суперпозиції цих форм – пурпурових кольорів унаслідок складання двох стимулів згідно з фізичними закономірностями [8].

Структурні особливості надмолекулярного пігментного комплексу протоціаніну безпосередньо пов'язані із використанням *Centaurea cyanus* у якості офіційної лікарської рослини (*Flores Centaureae cyani*) [9], оскільки саме крайові пелюстки синього кольору є основним об'єктом сировини квіток волошки синьої (не менше 90 % від загальної маси), а висушена сировина має зберігати свій природний синій колір [10]. Фармакогностичний аналіз за діагностичними ознаками є важливою процедурою ідентифікації рослинної субстанції, оскільки сировина квіток волошки синьої використовується за різним призначенням.

Для настою волошки синьої як офіційного препарату підтверджена сечогінна, жовчогінна дія, поліпшення функції травлення, а також можливість використання під час захворювання очей [9]. В експерименті для екстрактів квіток встановлена антиоксидантна, антигіпертензивна, цитопротекторна та антибактеріальна активності [11–13]. Біологічна активність фітокомпонентів обумовлює використання сировини волошки синьої для створення косметологічних засобів [14–16]. Особливості

фітохімічного складу сировини активно використовують для розвитку інноваційного напрямку – розробки функціональних харчових продуктів [17–19]. Волошку синю розглядають також як медоносну рослину, а волошковий мед відзначається вираженою антибактеріальною активністю [20].

Інший аспект використання сировини цієї рослини пов'язаний з світлопоглинальною здатністю протоціаніну. Так, за поєднання низькотемпературної водної екстракції та мікрокапсуляції ліофілізованих екстрактів запропонована технологія отримання порошоків натурального синього барвника для використання у харчових технологіях [21]. Цей факт є важливим з огляду на сучасну тенденцію заміни синтетичних добавок на екобезпечні пігменти природного походження [22]. Враховуючи надмолекулярну структуру протоціаніну, шляхом хімічної модифікації солей флавілю ліпофільними алкокси- або тіоєфірними замісниками отримано нові рідкокристалічні емісійні барвники [23].

Здатність фенольних сполук до зв'язування іонів металів використовують для «зеленого» синтезу на основі рослинного екстракту *Centaurea cyanus* наночастинок оксиду заліза як адсорбенту для фотокаталітичної деградації катіонного барвника [24].

З огляду на підвищення сучасних вимог до ідентифікації лікарської рослинної сировини, актуальний напрям удосконалення фармакогностичних досліджень пов'язано із застосуванням інструментальних методів аналізу [25]. Ураховуючи внутрішньовидовий поліхромізм квіток, для ідентифікації сировини волошки синьої необхідно виявлення фармакогностичних критеріїв на основі характеристик надмолекулярного комплексу протоціаніну, локалізованого у рослинних тканинах. Для вирішення цієї проблеми доцільно застосовувати твердофазну спектрофотометрію у видимому діапазоні, яка поєднує визначення відбивальних характеристик та фізичних параметрів кольору пігментованих рослинних тканин [26]. Інформативність такого методичного підходу підтверджено на прикладі досліджень металокомплексних сполук ціанідин 3-глюкозиду [27; 28].

Мета роботи – підтвердити можливість ідентифікації сировини волошки синьої на основі відбивальних і колориметричних характеристик надмолекулярного комплексу протоціаніну в пелюстках.

Експериментальна частина

Спектри поглинання вимірювали на спектрофотометрі Спекорд М40. Для дослідження спектрів відбиття цей спектрофотометр додатково обладнали інтегрованою фотометричною сферою та касетою для математичної обробки «Data Handling I», яка дозволяє проводити згладжування спектральних кривих із виключенням випадкових шумових піків [29]. У разі колориметричних вимірів використовували іншу касету для математичної обробки «Color Measurement».

За об'єкт дослідження використано різні типи крайових квіток *Centaurea cyanus* [29], які зоровим сприйняттям кольору відповідають білому (C1), червоному (C2), фіолетовому (C3), пурпуровому (C4) та синьому (C5) забарвленням. Відбір квіток здійснювали на стадії цвітіння рослин.

Виділення пігментних екстрактів із пелюсток волошки синьої проводили двома методами із використанням різних розчинників. Для екстракції нативного протоціаніну використовували 100 мг пелюсток типу C5 із синім забарвленням і 5 мл води за 20 °С. Після фільтрування екстракт розподіляли на два рівних за об'ємом варіанти (по 2.5 мл). До розчину першого варіанта додавали 0.1 мл води, а до другого – 0.1 мл 0.1 М HCl. Вимірювали спектри поглинання екстрактів і диференційний спектр розчину із додаванням HCl відносно екстракту за відсутності кислоти.

Для порівняльного аналізу різнозабарвлених типів C1, C2, C3, C4 і C5 проводили екстракцію за однакового співвідношенні наважки сировини пелюсток (20 мг) до об'єму екстрагенту (5 мл ізопропанол – 1 % HCl) упродовж 24 год за 4 °С. Спектри поглинання екстрактів вимірювали у кюветі 1 см.

Аналогічні умови вимірювання відбивальних та колориметричних параметрів квіток різнозабарвлених форм створювали за рахунок користування стандартним тримачем твердих зразків до спектрофотометру за умов повного покриття поверхні (діаметр 2 см). Інтенсивність спектрів відбиття у діапазоні 350–800 нм представляли в одиницях оптичної густини. Такий прийом дає можливість порівнювати стан хромофорів у рослинній тканині за даними спектрів відбиття та у розчині за характеристиками спектрів поглинання. Координати кольору (X,

Y, Z) та координати кольоровості (x, y) визначали в системі CIE XYZ. Домінуючу довжину хвилі λ_d встановлювали графічним способом за координатами зразків у кольоровому просторі [30].

Похибка вимірювань спектральних параметрів не перевищувала 5 %. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з 5 %-вим рівнем значущості.

Результати та їх обговорення

Для характеристики пелюстків типів **C1–C5** встановлено відбивальні та колориметричні характеристики, які підтверджують специфічність їх забарвлення (рис. 3, таблиця). Відмінна особливість форми із синім забарвленням **C5** – наявність у спектрі довгохвильової смуги із двома розділеними максимумами за 575 і 680 нм, які характеризують надмолекулярний комплекс протоціаніну, локалізований у поверхневих рослинних тканинах [4]. Прояв такої смуги слід пояснити на основі зв'язку електронних спектрів із структурою органічних сполук. Відомо, що для синіх пігментів характерна наявність смуги у діапазоні 600–700 нм [28]. Водночас слід зазначити, що лінійне спряження π -зв'язків у хромоформній системі само по собі не призводить до поглинання у

цьому діапазоні. Тому для структури синіх пігментів, як правило, характерна наявність спряжених π -зв'язків, ароматичних кільцевих систем, гетероатомів та іонних зарядів [31]. Саме таким вимогам задовольняє надмолекулярна структура протоціаніну (рис. 1), яка включає наступні особливості: 1) оксигеновмісна гетероциклічна система флавону із спряженими π -зв'язками і ауксохромними гідроксильними групами; 2) підвищене спряження у хромоформній системі сукцінілціаніну **1** за рахунок переходу із флавілієвої у 4'-кетохіноїдну форму; 3) попарна самоасоціація 6 молекул сукцінілціаніну **1** шляхом гідрофобної стекин-взаємодії; 4) попарна самоасоціація 6 молекул малонілфлавону **2** за аналогічним механізмом; 5) копігментація унаслідок утворення структурного ансамблю між парами самоасоційованих антоціанів **1** і флавонів **2**; 6) хелатування іонів Fe^{3+} і Mg^{2+} із катехольними фрагментами антоціанових пар. Такі особливості структурної організації протоціаніну зменшують енергію електронного переходу і забезпечують прояв довгохвильової смуги у спектрі відбиття типу **C5** та стимул у діапазоні синього кольору (λ_d 470.0 нм) адекватно візуальному спостереженню (рис. 3, таблиця).

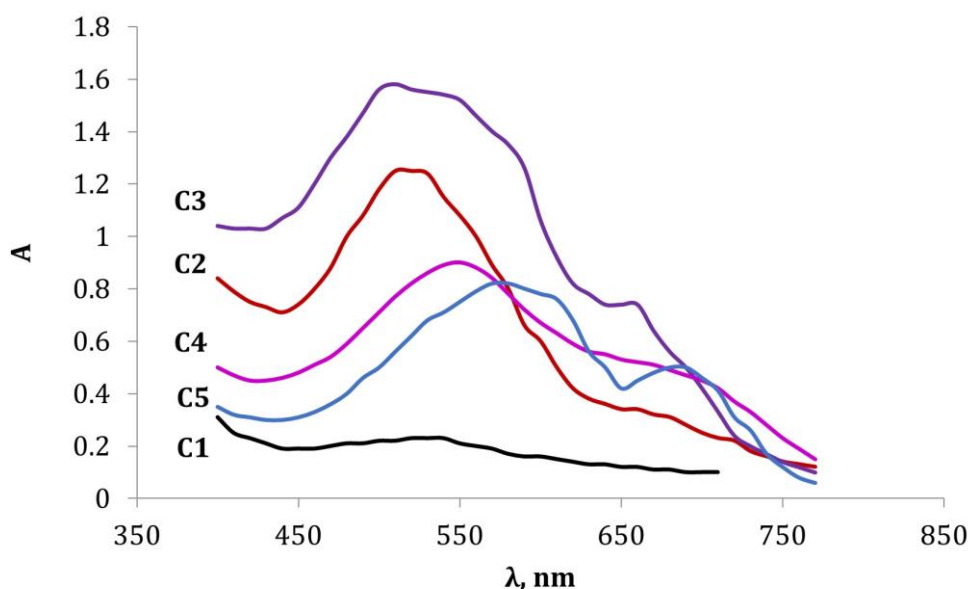


Fig. 3. Reflectance spectra of cornflower petals with different type of coloration
Рис. 3. Спектри відбиття пелюсток волошки синьої із різним типом забарвлення

Спектральні характеристики пелюсток інших типів **C1–C4** суттєво відрізнялись від типу із синім забарвленням. Так, для типу **C1** положення низькоінтенсивного короткохвильового максимуму у спектрі відбиття відповідало флавілієвій формі

антоціанів (529 нм) [8], а довгохвильовий максимум проявлявся як перегин біля 660 нм (рис. 3). Водночас координати кольоровості типу **C1** були близькі до координат білого рівноенергетичного стимулу, а значення λ_d (624.6 нм) знаходилось у діапазоні червоного

кольору, що обумовлено мінорною кількістю антоціанових пігментів.

Reflectance and colorimetric parameters of cornflower petals with different type of coloration

Table

Таблиця

Відбивальні та колориметричні параметри пелюсток волошки синьої із різним типом забарвлення

Type of coloration	λ_1 , нм	λ_2 , нм	A_{680}/A_{575}	λ_d , нм
White C1	529	660	0.54	624.6
Red C2	523	660	0.27	496.9*
Violet C3	525, 560	660	0.47	514.0*
Purple C4	550	668	0.56	562.4*
Blue C5	575	680	0.60	470.0

Note: *Additional wavelength in the purple range.

Кольорові стимули типів **C2–C4** за значеннями додаткової довжини хвилі відповідали пурпуровому діапазону (таблиця), а спектральні характеристики пелюсток пояснюють ефект їх візуального спостереження. Для типу **C2** наявність інтенсивного максимуму за 523 нм та менш інтенсивного максимуму за 660 нм обумовило домінування стимулу флавілієвої форми антоціану в суперпозиції з копигментованою формою. Для типу **C3**, окрім максимуму флавілієвої форми антоціану за 525 нм, проявлявся співставний за інтенсивністю максимум за 560 нм, що поряд із наявністю довгохвильового максимуму за 660 нм свідчило про домінування копигментованої форми в суперпозиції стимулів (рис. 3). Для типу **C4** спостерігалось гіпсохромне зміщення максимумів до 550 і 668 нм відносно типу **C5**, а суперпозиція стимулів обох форм антоціану у співставному співвідношенні обумовила сприйняття пурпурового кольору пелюсток під час спостереження.

Як порівняльний показник, що характеризує специфічність різнозабарвлених типів, використано співвідношення оптичної густини довго- та короткохвильового максимумів у спектрах відбиття типу **C5** із синім забарвленням (A_{680}/A_{575}). Для типу **C5** значення співвідношення A_{680}/A_{575} було максимальним (0.60), а для інших типів **C1–C4** знаходилось у діапазоні 0.27–0.56 (таблиця), що пов'язано із гіпсохромним зміщенням довгохвильової смуги.

Як відомо [6], серед факторів кольорової варіації різних типів волошки синьої відзначають рівень накопичення у рослинних тканинах похідних антоціанідинів і флавонів із різними варіантами глікозидування, а також співвідношення загального вмісту цих сполук. До того ж тільки для типу із синім забарвленням характерно домінування

сукцінілціаніну **1** і малонілфлавоноу **2** із специфічною величиною співвідношення загального вмісту копигмент : антоціан (1.6) [6]. Саме такі умови необхідні для молекулярного розпізнавання складових у процесі самозбирання надмолекулярного комплексу [4]. Для типу із червоним забарвленням замість сукцінілціаніну **1** встановлена наявність глікозидів пеларгонідину, а замість малонілфлавоноу **2** характерно домінування апігенін-7-О-глюкуроніду [6]. Для типу із пурпуровим забарвленням у складі антоціанів окрім сукцінілціаніну **1** виявлені інші глікозиди ціанідину, а замість малонілфлавоноу **2** – глікозид лютеоліну [6]. Для типу із фіолетовим забарвленням ідентифіковані похідні ціанідину, а серед копигментів – глікозиди апігеніну і лютеоліну [6]. Така варіабельність складу антоціанів і потенційних копигментів, а також різна ступінь копигментації створює багатоваріантність взаємодії пігментованих рослинних тканин із випромінюванням видимого діапазону, що приводить до специфічності спектрів відбиття різнозабарвлених типів (рис. 3).

Для дослідження пігментів *in vitro* використовували два варіанти екстракції, які забезпечують різну інформативність результатів. Перший варіант – водна екстракція нативного протоціаніну із пелюсток типу **C5** із синім забарвленням. У спектрі поглинання водного синього екстракту спостерігались два максимуми: основний за 593 нм і мінорний за 682 нм (рис. 4), прояв яких відповідав характеристикам протоціаніну *in vivo* у спектрах відбиття пелюсток типу **C5** (рис. 3). Слід також зазначити, що встановлене положення максимумів у спектрі поглинання нативного надмолекулярного пігменту погоджувалось із відомими спектральними

параметрами препаративно виділеного протоціаніну [4]. Додавання до пігментного екстракту 0.1 н HCl призводить до руйнування протоціаніну з утворенням неасоційованої флавілієвою форми сукцінілціаніну **1** із червоним забарвленням, що відповідало максимуму поглинання за 549 нм в спектрі поглинання (рис. 4). Відмінність спектральних властивостей хромофорних систем цих форм

встановлена за параметрами диференційного спектру неасоційованого сукцінілціаніну **1** відносно хелатованого у складі протоціаніну (максимуми за 566 та 704 нм і мінімуми за 634 та 735 нм) (рис. 4). Диференційна спектрофотометрія може бути використана як методичний підхід для дослідження металлоантоціанових комплексів.

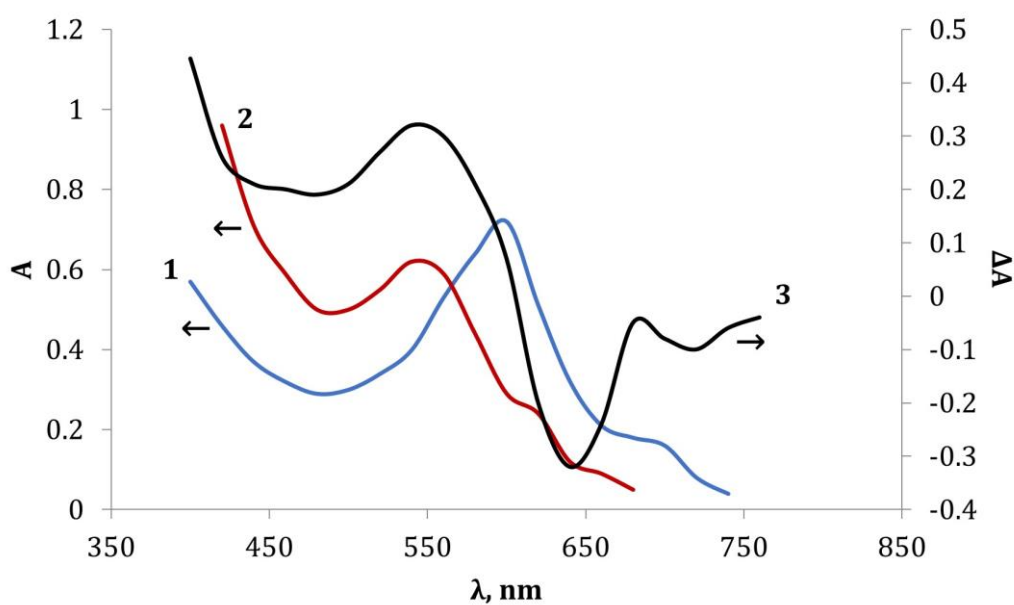


Fig. 4. Absorption spectra of pigment extracts of cornflower petals (type C5): 1 - water extract; 2 - water extract + 0.1 M HCl; 3 - difference spectrum

Рис. 4. Спектри поглинання пігментних екстрактів пелюсток волошки синьої (тип C5): 1 - водний екстракт; 2 - водний екстракт + 0.1 М HCl; 3 - диференційний спектр

Інший варіант виділення антоціанів – спиртова екстракції у кислому середовищі із руйнуванням пігментних комплексів, які локалізовані у поверхневих тканинах пелюсток, і утворенням похідних флавілія. Такий підхід дозволив порівнювати стан антоціанових пігментів *in vitro* та *in vivo* за проявом смуг, положенням максимумів у спектрах поглинання екстрактів і спектрів відбиття пелюсток, оскільки в обох випадках інтенсивність представлена в одиницях оптичної густини. Разом з тим слід зазначити, що інтенсивність максимумів у спектрах відбиття обумовлена локалізацією антоціанів у поверхневих тканинах, які безпосередньо взаємодіють із випромінюванням видимого діапазону, а інтенсивність максимумів у спектрах поглинання екстрактів – із загальним вмістом пігментів у рослинному препараті. У разі проведення екстракції за аналогічних умов та однакового співвідношенні маси пелюсток та об'єму розчинника можливий порівняльний аналіз вмісту антоціанів за величиною оптичної

густини максимуму поглинання. На відміну від спектрів відбиття пелюсток із розподіленою смугою (рис. 3), особливістю спектрів поглинання екстрактів є наявність одного максимуму, положення якого залежить від типу забарвлення (рис. 5). За положенням максимуму у спектрах поглинання екстрактів досліджені типи розподілено на дві групи (типи C1, C2 – 520 нм, типи C3, C4, C5 – 540–541 нм), що, згідно із відомими даними [6], у першому випадку свідчить про домінування похідних пеларгонідину, а у другому – глікозидів ціанідину. Слід зазначити, що у спектрі поглинання екстракту типу C5 у кислому спиртовому середовищі (рис. 5) спостерігався максимум (541 нм), близький за положенням до максимуму (549 нм) у спектрі поглинання водного екстракту протоціаніну із додаванням HCl (рис. 4, крива 2), що підтвердило домінування в обох випадках флавілієвої хромофорної системи та обумовило червоне забарвлення цих екстрактів.

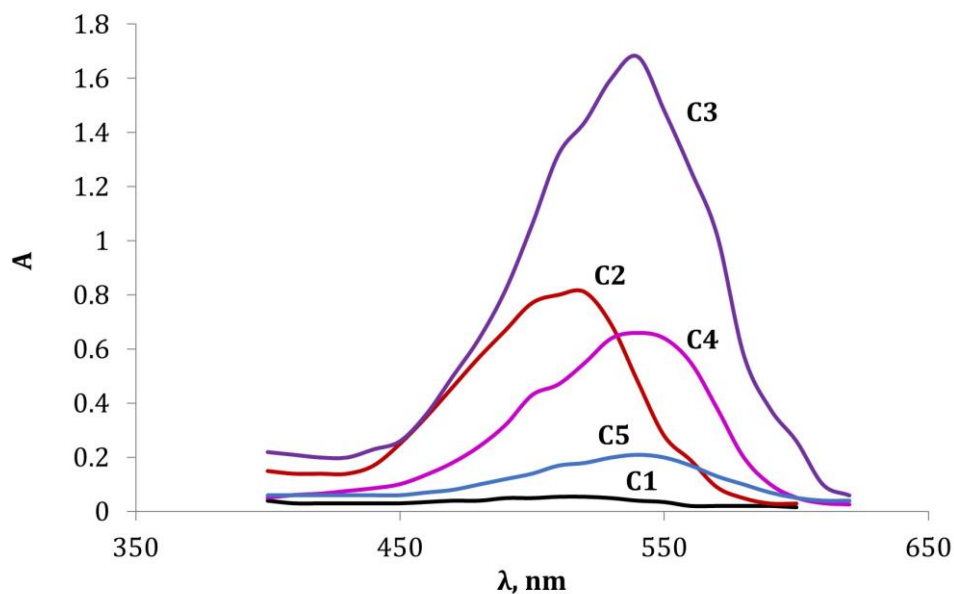


Fig. 5. Absorption spectra of pigment extracts of cornflower petals with different types of coloration (isopropanol - 1% HCl)

Рис. 5. Спектри поглинання пігментних екстрактів пелюсток волошки синьої із різним типом забарвлення (ізопропанол - 1 % HCl)

Підвищення інтенсивності максимуму у спектрах поглинання екстрактів (A_{\max}) відбувалось для різних типів у наступній послідовності: C1 - C5 - C4 - C2 - C3 (рис. 6). Така ж послідовність спостерігалась для інтенсивності короткохвильового максимуму (525–575 nm) у спектрах відбиття пелюсток різного типу (рис. 3). Аналогічну тенденцію також підтверджено раніше на основі визначення загального вмісту антоціанів у пелюстках із різним забарвленням [6]. Згідно з отриманими результатами максимальний вміст антоціанів відзначено для типу C3 із фіолетовим забарвленням (рис. 6), а співвідношення A_{\max} для екстрактів пелюсток типів C5 і C3 склало 8.8. За даними роботи [6]

встановлено приблизний рівень перевищення загального вмісту антоціанів у пелюстках типу із фіолетовим забарвленням відносно типу із синім забарвленням (у 7.3 рази). Такі результати підтверджують, що для утворення *in vivo* протоціаніну максимальний вміст антоціанів не є визначальним чинником. Натомість важливими чинниками слід вважати хімічну структуру антоціану із хелатуючим катехольним фрагментом (сукцінілціанін 1), копігменту (малонілфлавіон 2), їх співвідношення та інші умови, які забезпечують молекулярне розпізнавання цих компонентів у процесі самозбирання надмолекулярного пігментного комплексу *in vivo*.

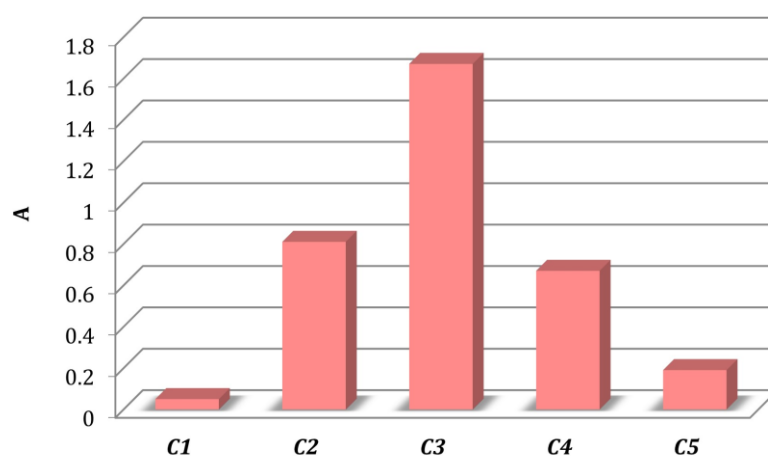


Fig. 6. Intensity of maximum in absorption spectra of pigment extracts of cornflower petals with different types of coloration (isopropanol - 1 % HCl)

Рис. 6. Інтенсивність максимуму у спектрах поглинання пігментних екстрактів пелюсток волошки синьої із різним типом забарвлення (ізопропанол - 1 % HCl)

Аналізуючи отримані результати слід зазначити, що для фармакогностичного аналізу сировини квіток волошки синьої може бути використана наступна сукупність визначальних спектральних характеристик надмолекулярного пігментного комплексу протоціаніну у пелюстках: наявність довгохвильової смуги із розподіленими максимумами за 575 і 680 нм у спектрі відбиття та кольоровий стимул із домінують довжиною хвилі у діапазоні синього кольору. Встановлені нами діагностичні ознаки відрізняють тип із синім забарвленням як основний об'єкт під час заготівлі сировини офіційної лікарської рослини *Centaurea cyanus* від інших різнозабарвлених типів за умов внутрішньовидового поліхроїзму квіток. Водночас отримані нами результати підтверджують, що сумарний вміст антоціанових пігментів (у перерахунку на ціанідин-3,5-диглікозид) як один із показників якості [9] не може бути маркерною ознакою для цільового об'єкту заготівлі сировини. Застосування твердофазної спектрофотометрії слід розглядати у контексті актуальності використання інструментальних методів аналізу для удосконалення фармакогностичних досліджень на первинних стадіях виробництва лікарської рослинної сировини [25]. Сукупність використаних прийомів спектроскопії відбиття та колориметрії розширює методичну базу неруйнівного аналізу в ході використання сировини волошки синьої у виробництві біопрепаратів і функціональних харчових продуктів [21, 32–35].

Інший аспект отриманих результатів пов'язано із розробкою нових методичних підходів для дослідження структурної організації супрамолекулярних пігментних комплексів та ефекту копігментації антоціанів у створенні унікальних спряжених хромофорних систем, які обумовлюють синє забарвлення рослинних об'єктів [36]. Для встановлення відмінностей у світлопоглинальних властивостях копігментованої та неасоційованої форм антоціанів може бути використаний прийом диференційної спектрофотометрії.

Незважаючи на складність надмолекулярної структури протоціаніну,

сировина волошки синьої може бути ідентифікована шляхом неруйнівного аналізу сукупності відбивальних та колориметричних характеристик, що підтверджує можливий зв'язок супрамолекулярної хімії нативних пігментних систем і фармакогнозії.

Висновки

Із використанням твердофазної спектрофотометрії встановлено, що для фармакогностичного аналізу сировини квіток волошки синьої може бути використана сукупність спектральних характеристик надмолекулярного пігментного комплексу протоціаніну у пелюстках: наявність довгохвильової смуги із розподіленими максимумами у спектрі відбиття та кольоровий стимул із домінують довжиною хвилі у діапазоні синього кольору. Встановлені діагностичні ознаки відрізняють тип із синім забарвленням як основний об'єкт під час заготівлі сировини офіційної лікарської рослини *Centaurea cyanus* від інших різнозабарвлених типів за умов внутрішньовидового поліхроїзму квіток. Нативний протоціанін отримано у результаті водної екстракції пелюсток із синім забарвленням. Прояв максимумів у спектрі поглинання водного синього екстракту відповідав характеристикам протоціаніну *in vivo* у спектрах відбиття пелюсток типу із синім забарвленням. Відмінність спектральних властивостей хромофорних систем цих форм встановлена за параметрами диференційного спектру поглинання розчину неасоційованого антоціану після кислотної руйнації нативного пігментного комплексу відносно екстракту протоціаніну. За умов спиртової екстракції пелюсток у кислому середовищі відбувалось руйнування пігментних комплексів, які локалізовані у поверхневих тканинах, і утворення похідних флавілія. На відміну від спектрів відбиття різнозабарвлених пелюсток із розподіленою смугою, особливістю спектрів поглинання їх екстрактів є наявність одного максимуму, положення якого залежало від типу забарвлення та свідчило про домінування глікозидів пеларгонідину або ціанідину. Отримані результати удосконалюють фармакогностичні критерії та можуть бути використані під час створення біопрепаратів і функціональних харчових продуктів на основі сировини волошки синьої як біологічно активного інгредієнта.

References

- [1] Steed, J. W., Atwood, J. L. (2022). *Supramolecular chemistry* (3th ed.). Wiley.
- [2] Pina, F., Basílio, N., Parola, A. J., Melo, M. J., Oliveira, J., de Freitas, V. (2023). The triumph of the blue in nature and in Anthropocene. *Dyes and Pigments*, 210, 110925. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110925>
- [3] Houghton, A., Appelhagen, I., Martin, C. (2021). Natural blues: Structure meets function in anthocyanins. *Plants*, 10(4), 726. <https://doi.org/10.3390/plants10040726>
- [4] Yoshida, K., Mori, M., Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.*, 26(7), 884–915. <https://doi.org/10.1039/B800165K>
- [5] Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chem. Rev.*, 116, 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>
- [6] Deng, C., Li, S., Feng, C., Hong, Y., Huang, H., Wang, J., Wang, L., Dai, S. (2019). Metabolite and gene expression analysis reveal the molecular mechanism for petal colour variation in six *Centaurea cyanus* cultivars. *Plant Physiol. Biochem.*, 142, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.018>
- [7] Deng, C., Wang, J., Lu, C., Li, Y., Kong, D., Hong, Y., Huang, H., Dai, S. (2020). CcMYB6-1 and CcbHLH1, two novel transcription factors synergistically involved in regulating anthocyanin biosynthesis in cornflower. *Plant Physiol. Biochem.*, 151, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.024>
- [8] Fedenko, V. S., Shemet, S. A., Landi, M. (2017). UV-vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: An overview of *in vitro* and *in vivo* techniques. *J. Plant Physiol.*, 212, 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jiplph.2017.02.001>
- [9] Upyr, L. V. (2010). [Cornflower. In *Pharmaceutical encyclopedia*] (2th ed.). Kyiv, Ukraine: MORION (in Ukrainian). <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1798/voloshka>
- [10] Kovalev, V. M., Marchyshin, S. M., Hvorost, O. P., Isakova, T. I. (Eds). (2014). *Workshop on the identification of medicinal plant raw materials*. Ternopil, Ukraine: TDMU (in Ukrainian).
- [11] Escher, G. B., Santos, J. S., Rosso, N. D., Marques, M. B., Azevedo, L., do Carmo, M. A. V., Daguerd, H., Molognonid, L., do Prado-Silvae, L., Sant'Anae, A. S., da Silva, M. C., Granato, D. (2018). Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. *Food Chem. Toxicol.*, 118, 439–453. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.046>
- [12] Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., Ferreira, I. C. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Ind. Crops Prod.*, 128, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.059>
- [13] Al-Snafi, A. E. (2015). The pharmacological importance of *Centaurea cyanus* – A review. *Int. J. Pharm. Rev. Res.*, 5(4), 379–384.
- [14] Uçar, M. A., Derun, E. M., Pişkin, M. B. (2023). Determination of usage potential of *Hypericum perforatum*, *Hypericum capitatum*, *Centaurea cyanus* extracts and creams in the cosmetic industry. *Sigma*, 41(3), 443–450. <https://doi.org/10.14744/sigma.2023.00051>
- [15] Michalak, M. (2023). Plant extracts as skin care and therapeutic agents. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 15444. <https://doi.org/10.3390/ijms242015444>
- [16] Papa, C. M., Suciuc, A., Dopcea, I., Ene, N., Singh, S.K., Vamanu, E. (2023). Exploring the efficacy of extracts for cosmetic creams: *In vivo* and *in vitro* assessments. *Nutraceuticals*, 3, 306–314. <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals3030024>
- [17] Pires Jr, E. D. O., Di Gioia, F., Roupheal, Y., García-Caparrós, P., Tzortzakakis, N., Ferreira, I. C., Barros, L., Petropoulos, S.A., Caleja, C. (2023). Edible flowers as an emerging horticultural product: A review on sensorial properties, mineral and aroma profile. *Trends Food Sci. Technol.*, 137, 31–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.05.007>
- [18] Teixeira, M., Tao, W., Fernandes, A., Faria, A., Ferreira, I. M., He, J., de Freitas, V., Mateus, N., Oliveira, H. (2023). Anthocyanin-rich edible flowers, current understanding of a potential new trend in dietary patterns. *Trends Food Sci. Technol.*, 138, 708–725. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.010>
- [19] Janarny, G., Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D.S. (2021). Nutraceutical potential of dietary phytochemicals in edible flowers—A review. *J. Food Biochem.*, 45(4), e13642. <https://doi.org/10.1111/jfbfc.13642>
- [20] Kuš, P. M., Jerković, I., Tuberoso, C. I. G., Marijanović, Z., Congiu, F. (2014). Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: Chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others. *Food Chem.*, 142, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.050>
- [21] Różyło, R., Szymańska-Chargot, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D. (2021). Spectroscopic, mineral, and antioxidant characteristics of blue colored powders prepared from cornflower aqueous extracts. *Food Chem.*, 346, 128889. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128889>
- [22] Vega, E. N., Ciudad-Mulero, M., Fernández-Ruiz, V., Barros, L., Morales, P. (2023). Natural sources of food colorants as potential substitutes for artificial additives. *Foods*, 12(22), 4102. <https://doi.org/10.3390/foods12224102>
- [23] Forschner, R., Knoeller, J. A., Zens, A., Frey, W., Molard, Y., Laschat, S. (2023). Luminescent liquid crystals: from supramolecular plant dyes to emissive flavylum salts. *Liq. Cryst.*, 50(7-10), 1310–1323. <https://doi.org/10.1080/02678292.2023.2179122>
- [24] Jaison, J. P., Balasubramanian, B., Gangwar, J., James, N., Pappuswamy, M., Anand, A. V., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Liu, W.-C., Sebastian, J. K. (2023). Green synthesis of bioinspired nanoparticles mediated from plant extracts of *Asteraceae* family for potential biological applications. *Antibiotics*, 12(3), 543. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030543>
- [25] Hlushchenko, L. A., Kutsenko, N. I. (2023). Problems with identification of medicinal plants and medicinal plant raw materials. *J. Native Alien Plant Stud.*, 19, 38–52 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.37555/2707-3114.19.2023.293647>
- [26] Fedenko, V. S. (2006). [Cyanidin complexation with metal ions]. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal*, 78(2), 149–152 (in Ukrainian).

- [27] Fedenko, V. S. (2007). [Dose effect of cyanidin interaction with lead ions in roots of maize seedlings]. *Ukrains' kyi Biokhimichniy Zhurnal*, 79(2), 24–29 (in Ukrainian).
- [28] Fedenko, V. S. (2008). [Cyanidin as endogenous chelator of metal ions in maize seedling roots]. *Ukrains' kyi Biokhimichniy Zhurnal*, 80(1), 102–106 (in Ukrainian).
- [29] Fedenko, V. S., Landi, M., Shemet, S. A. (2017). Detection of nickel in maize roots: A novel nondestructive approach by reflectance spectroscopy and colorimetric models. *Ecol. Indic.*, 82, 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.07.021>
- [30] Fedenko, V. S. (2022). Chemisorption of flavonoids from canadian goldenrod on aluminum oxide. *J. Chem. Technol.*, 30(3), 340–348 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15421/jchemtech.v30i3.262972>
- [31] Newsome, A. G., Culver, C. A., Van Breemen, R. B. (2014). Nature's palette: the search for natural blue colorants. *J. Agric Food Chem.*, 62(28), 6498–6511. <https://doi.org/10.1021/jf501419q>
- [32] Haratym, W., Weryszko-Chmielewska, E., Konarska, A. (2020). Microstructural and histochemical analysis of aboveground organs of *Centaurea cyanus* used in herbal medicine. *Protoplasma*, 257, 285–298. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01437>
- [33] Brangule, A., Šukele, R., Bandere, D. (2020). Herbal medicine characterization perspectives using advanced FTIR sample techniques—diffuse reflectance (DRIFT) and photoacoustic spectroscopy (PAS). *Front. Plant Sci.*, 11, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00356>
- [34] Różyło, R., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D. (2022). Microencapsulated red powders from cornflower extract—spectral (FT-IR and FT-Raman) and antioxidant characteristics. *Molecules*, 27(10), 3094. <https://doi.org/10.3390/molecules27103094>
- [35] Żbik, K., Onopiuk, A., Szpicer, A., Kurek, M. (2023). Comparison of the effects of extraction method and solvents on biological activities of phytochemicals from selected violet and blue pigmented flowers. *J. Food Meas. Charact.*, 17(6), 6600–6608. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02158-2>
- [36] Bruni, S., Longoni, M., Minzoni, C., Basili, M., Zocca, I., Pieraccini, S., Sironi, M. (2023). Resonance Raman and visible micro-spectroscopy for the in-vivo and in-vitro characterization of anthocyanin-based pigments in blue and violet flowers: A Comparison with HPLC-ESI-MS analysis of the extracts. *Molecules*, 28(4), 1709. <https://doi.org/10.3390/molecules28041709>